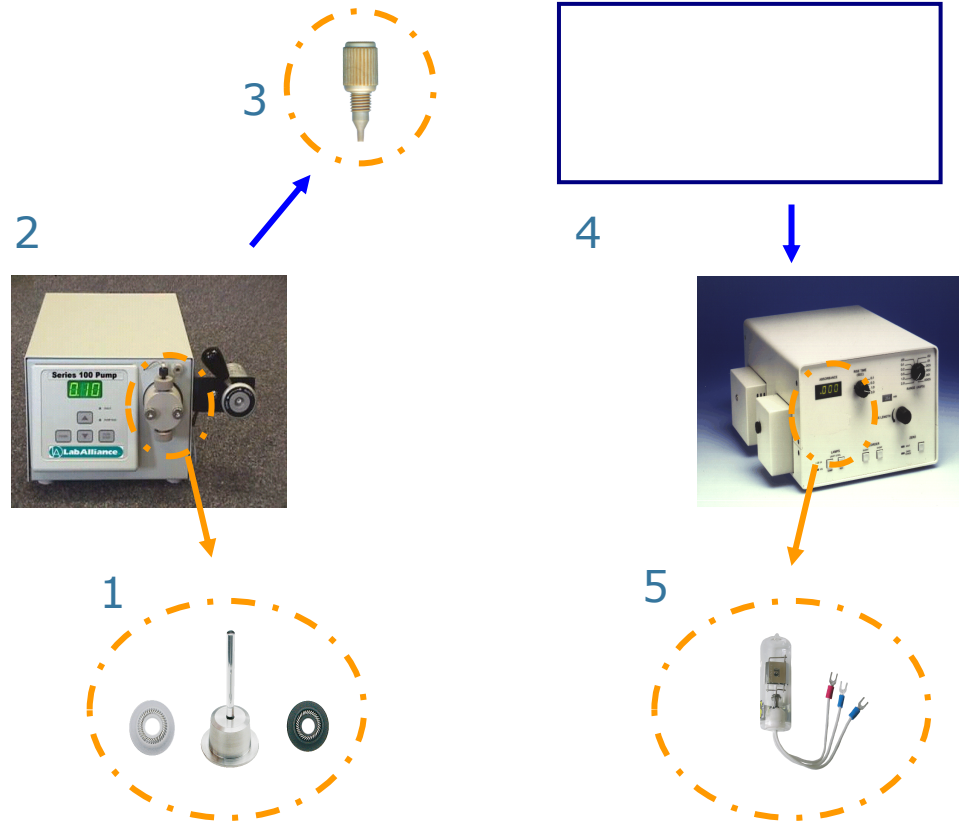


# Chromatographie Liquide

Notions fondamentales et paramètres utiles

# 1. La chaine HPLC

## 1.1 Le schéma



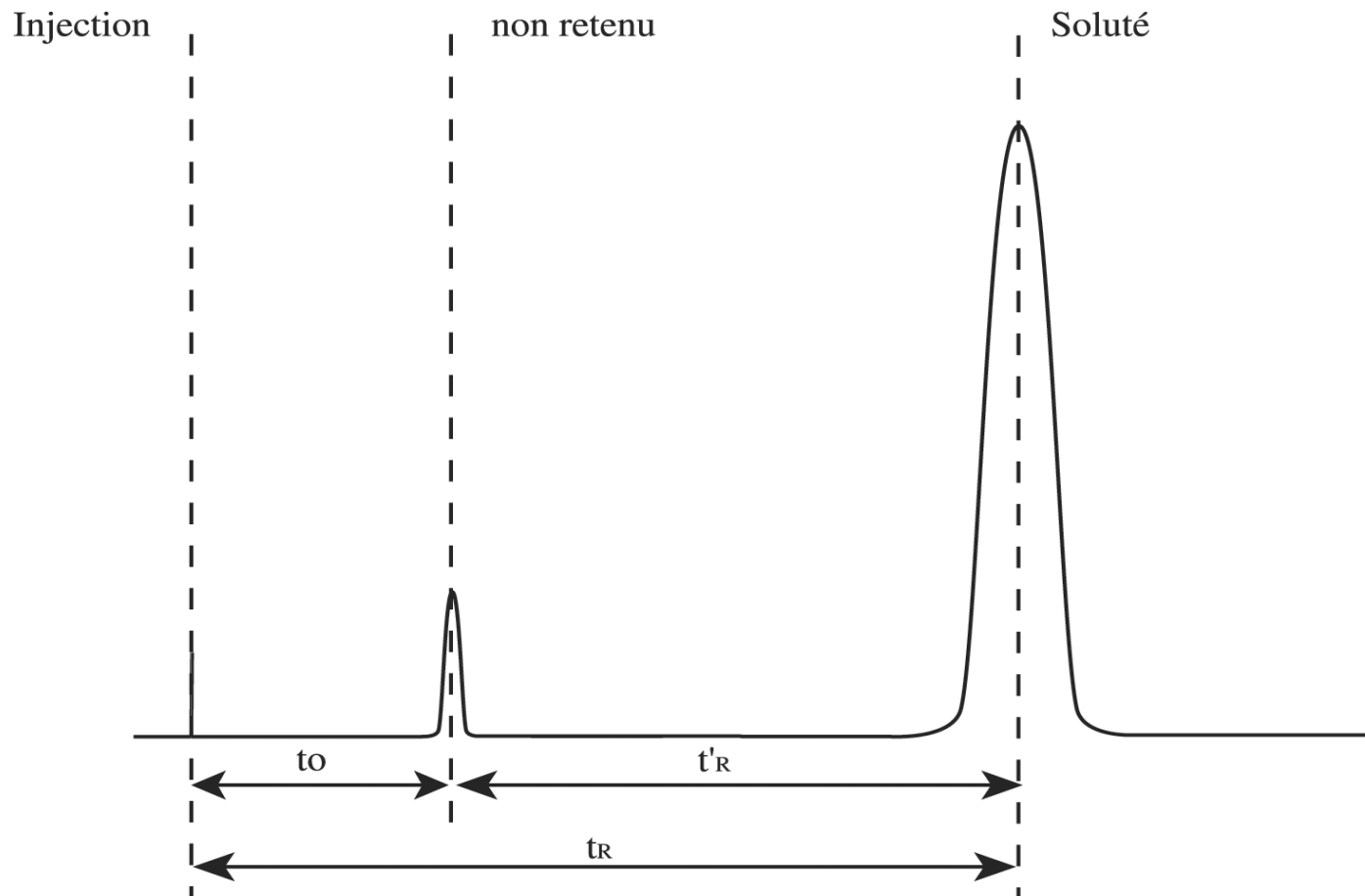
1 – Joints de piston et piston (saphir, céramique,...)

2 – Filtre (agit sur l'échantillon)

3 – Lampe HPLC

4 – Précolonne de saturation (protège la colonne de separation de l'agressivité de la phase mobile)

## 2. Paramètres liés à la rétention

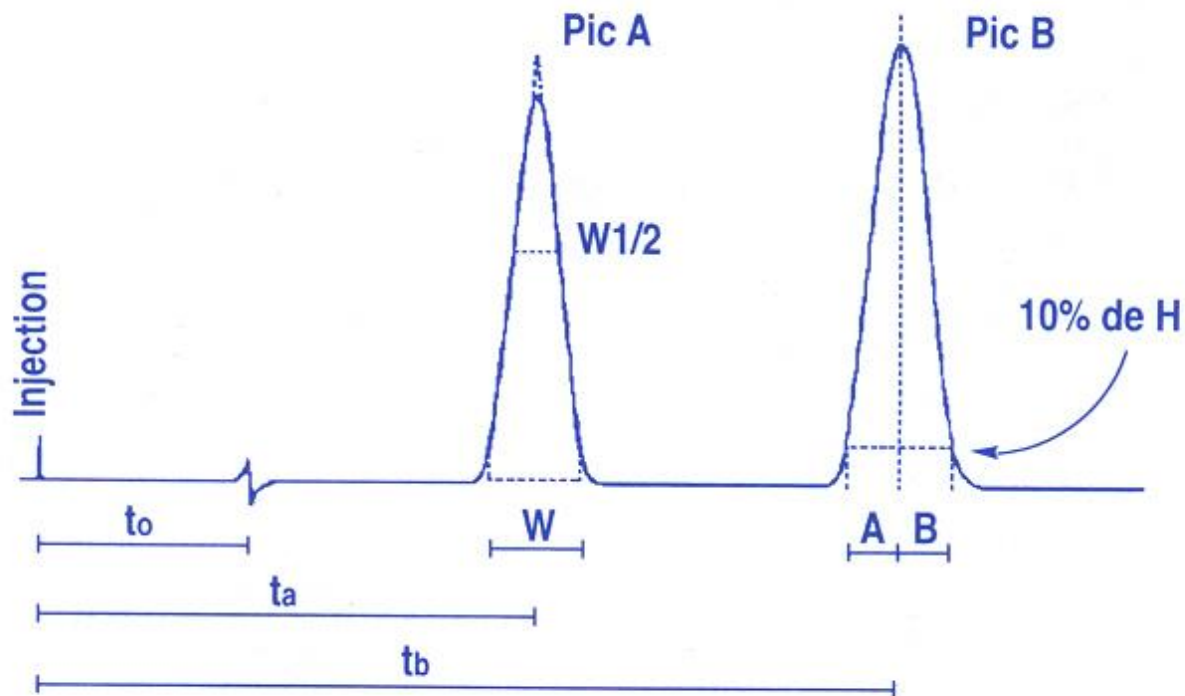


Constante	Définition	Commentaires
$V_0$	Volume mort (ou vide en mL) de la colonne $V_0 = D \times t_0$	C'est le volume de rétention du non-retenu. Il est lié au vide entre et dans les particules (pour une silice de <b>5µm</b> , 50-75% du volume géométrique de la colonne)
$t_0$	Temps de rétention d'un composé non-retenu (min)	Un composé non retenu est un composé sans interaction avec la phase stationnaire (ne pas confondre avec un composé exclu*)
$D$	Débit du liquide vecteur dans la colonne (mL/min)	
$t_R$	Temps de rétention mesuré au sommet du pic (min)	Temps passé par le composé dans l'appareillage chromatographique mais qui est susceptible de varier en fonction : du débit (fuite), de la température (saison), de la phase mobile (évaporation, additifs de stabilisation), du vieillissement de la
$t'_R$	Temps de rétention réduit $t'_R = t_R - t_0$	Temps de séjour d'un composé passé dans ou sur la phase stationnaire
$k$	Facteur de rétention (ou de capacité) $k = (t_R - t_0) / t_0$	Paramètre fondamental caractérisant la rétention du composé par le système chromatographie indépendant du débit. Pour un même composé et 2 analyses différentes, si on observe : -2 $t_R \neq$ et 2 $k =$ : problème de fuite avant la colonne -2 $t_R \neq$ et 2 $k \neq$ : problème de phase mobile ou stationnaire

Tableau 1 :

\* Composé dont le volume moléculaire empêche sa diffusion dans les pores du gel

### 3. Paramètres liés à l'efficacité de l'appareillage



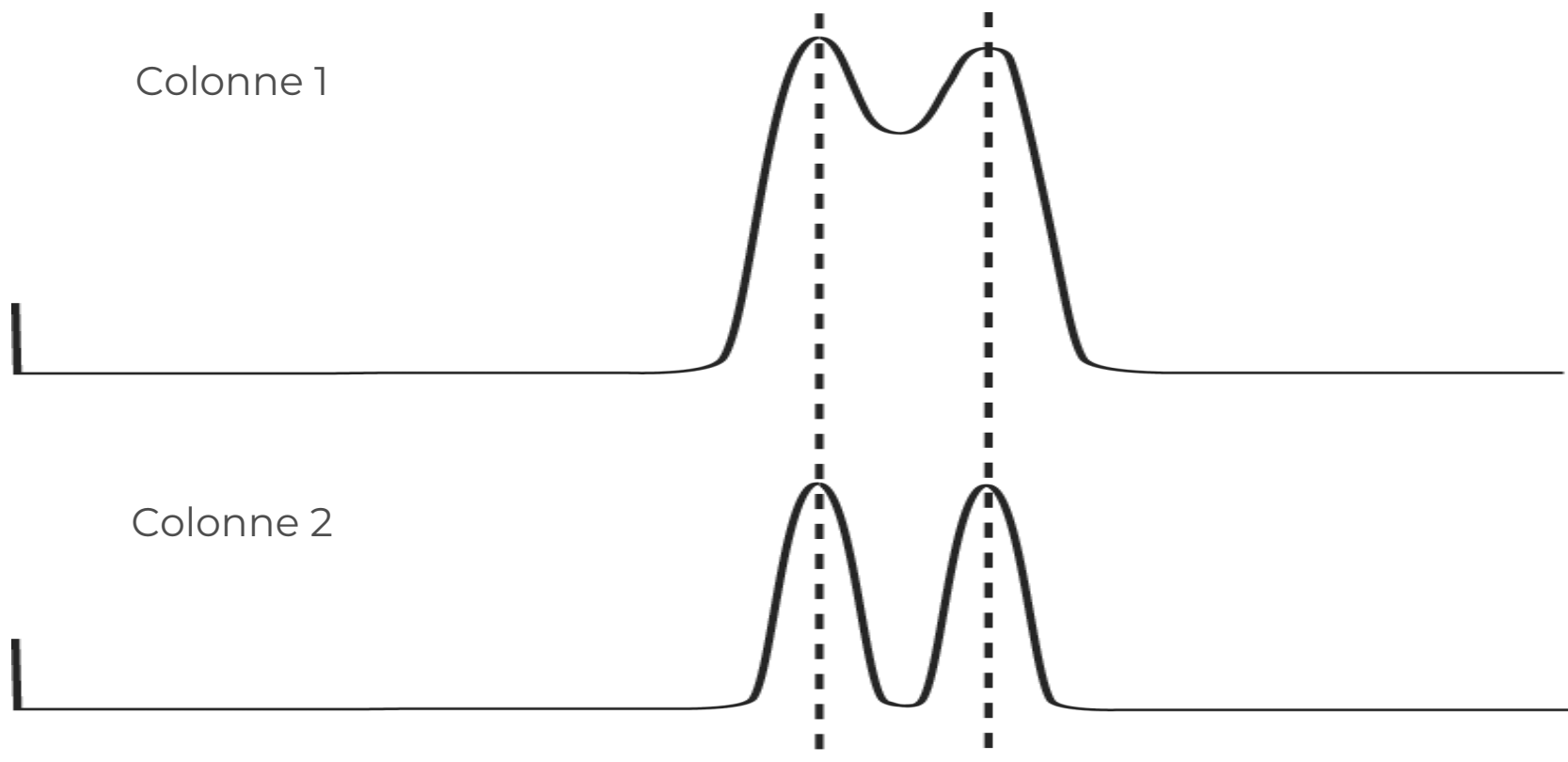
$t_R$  : temps de rétention

$W_t$  : largeur du pic à la base en unité de temps

Constante	Définition	Commentaires
N (pic symétrique) N (pic asymétrique)	Efficacité $N = 16 (t_R/W_t)^2$ $= 5.54 (t_R/W_{1/2t})^2$ $N=41.7*(tr/w_{0.1})^2/(A/B+1.25)$	On appelle plateau théorique la portion de phase stationnaire dans laquelle un soluté est en équilibre de répartition entre la phase mobile et stationnaire (chaque plateau pouvant alors être assimilé à une ampoule à décanter)
H	Hauteur d'un plateau théorique $H = L/N$ (L : longueur de la colonne)	Un H faible est synonyme d'une meilleure efficacité
h	Hauteur d'un plateau théorique réduit $h = H/d_p$	Grandeur fondamentale permettant de comparer deux systèmes chromatographiques en faisant abstraction de la géométrie de colonne et du remplissage.
$d_p$	Diamètre des particules	Généralement indiqué « granulométrie »
As	Asymétrie $As = B/A$	Asymétrie de pic à 10% de la hauteur
N (pic symétrique) N (pic asymétrique)	Efficacité $N = 16 (t_R/W_t)^2$ $= 5.54 (t_R/W_{1/2t})^2$ $N=41.7*(tr/w_{0.1})^2/(A/B+1.25)$	On appelle plateau théorique la portion de phase stationnaire dans laquelle un soluté est en équilibre de répartition entre la phase mobile et stationnaire (chaque plateau pouvant alors être assimilé à une ampoule à décanter)

Tableau 2 :  
L'efficacité (caractérisée par N) augmente quand L augmente et quand  $d_p$  diminue pour un débit et une température fixes.

## 4. Paramètres liés à la separation



Constante	Définition	Commentaires
$\alpha$	<p>Sélectivité</p> $\alpha = t'_{R2} / t'_{R1} = k_2 / k_1$	<p>Précise les positions relatives de deux pics adjacents <b><math>\alpha \neq 1</math></b> ; condition nécessaire mais non suffisante à une bonne résolution. Il faut en plus un retour à la ligne de base du premier pic avant que le second ne démarre.</p>
$R_s$	$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_2}{k_2 + 1}$	<p>En HPLC analytique, on estime que la résolution minimale pour détecter deux pics de hauteur voisine doit être de 0,6 et de 1,5 pour un retour à la ligne de base.</p>

Tableau 3





## Conseils pratiques pour l'élaboration d'une méthode d'analyse

## Étape 1 : Uptiselect Kit

## Étape 2 : Paramètres influençant le développement et l'optimisation d'une méthode HPLC

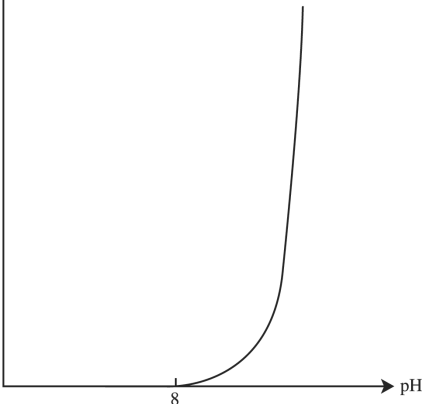
### 2.1 L'échantillon

Connaître la nature de son échantillon (miscibilité, composé ionisable ou non, pKa, stabilité par rapport au pH, polarité,...) est important pour faire les bons choix dans les étapes qui vont suivre. Si la composition du mélange est connue, il est vivement conseillé de se procurer les standards correspondant à chacun des différents solutés du mélange, de manière à mieux cerner leur comportement individuel.

Si le mélange est inconnu, il est important de réfléchir aux différentes étapes ayant conduit à ce mélange afin d'avoir une idée sur le type de soluté que l'on peut y retrouver.

#### *Influence du pH*

Pensez à tamponner l'éluant : gardez à l'esprit qu'une simple variation de température peut provoquer une variation de pH si le milieu n'est pas tamponné. Or, une petite variation de pH peut provoquer de grandes variations de temps de rétention (comme le montre le graphique ci-dessous).

	Acide	Base
Tampon	Tamponner à un pH < de 2 ou 3 unités au pKa	Tamponner à pH > de 2 unités au pKa
Commentaires	<p>À partir de pH 2, un greffage en court est plus facilement hydrolysable ! (ex : C8 par rapport à la C18)</p> <p>→ Si le pKa du produit est trop bas, il faut alors travailler à un pH tel que la forme ionisée soit toujours présente. Dans ce cas, il est nécessaire d'ajouter un contre-ion qui formera un agrégat neutre qui, lui, sera retenu sur la colonne.</p>	<p>↑ Vitesse d'hydrolyse de la silice</p>  <p>À partir de pH 8, la silice est de plus en plus soluble dans l'eau</p> <p>→ Si pKa du produit est trop haut : utiliser un contre-ion</p>

### *Préparation de l'échantillon*

Il peut être utile d'extraire le soluté par une méthode d'extraction en phase solide SPE (voir notre « guide SPE »). Toujours filtrer l'échantillon : en général, il est conseillé d'utiliser un filtre de porosité 0,45  $\mu\text{m}$

## 2.2 Choix de la colonne

### *Choix de la colonne selon le pH de la phase mobile*

pH	Colonne
$2 < \text{pH} < 8$	Compatible avec la plupart des supports pour chromatographie
$\text{pH} < 2$	Il faut faire attention à l'utilisation de silice greffée alkyl à faible longueur de chaîne.
$\text{pH} > 8$	Emploi d'un gel polystyrène-divinylbenzène (PSDVB, stable jusqu'à pH 12) ou de silice spécialement traitée pour supporter des pH allant de 8 à 10 (type HSC). Pour pallier le problème de la dissolution de la silice, la phase mobile peut être saturée en silice en introduisant une colonne de saturation entre la pompe et l'injecteur.

### *Choix d'une silice poreuse ou non poreuse*

L'utilisation d'une silice poreuse permet d'augmenter la surface de contact avec le soluté (elle est utilisée de préférence, sauf dans le cas où l'interaction du soluté avec la phase stationnaire est déjà très forte).  
Diamètre des pore en fonction de la masse du composé.

100A	Jusqu'à 2,5 K Daltons
300A	1,5 K à 400 K Daltons
500A	Jusqu'à 1000 K Daltons
1000A	Jusqu'à environ 1500 K Daltons
4000A	Jusqu'à 10 000 K Daltons (non mesuré)

### *Choix du type de silice*

Les silices de première génération possèdent un taux de résidu en métaux important, ce qui rend les silanols résiduels plus acides et donc plus réactifs vis-à-vis des composés basiques (d'où trainées de pics).

Par contre, les silices de seconde génération sont traitées durant leurs procédés de fabrication : le taux de métaux résiduels est extrêmement faible, diminuant ainsi les trainées de pics.

**Exemple** : Uptisphere : 99,995% pure avec traces de métaux inférieurs à 20ppm (Fe inférieur à 1ppm).

Il est donc préférable pour l'analyse de composés basiques d'employer :

- Silice ultrapure de seconde génération (les traces de métaux présents dans la silice ont été éliminées).
- Silice « end-capped » (recouvrement total) : le « end-capped » consiste en un traitement de la silice visant à recouvrir les silanols résiduels par un groupement triméthylé ou autre.
- Ajout de TEA (pure et distillée) dans l'éluant : la TEA a une forte affinité pour les silanols résiduels (réactivité supérieure à celle des composés basiques) et présente l'avantage de ne pas être détectée en UV.
- Greffage ayant des groupements à fort encombrement stérique de manière à rendre l'accès aux silanols résiduels plus difficile.
- Greffage avec des groupements polaires incorporés (type shieldée)

### **Schéma de colonne type shieldée**

Graphite poreux : la séparation des composés non polaires est similaire à celle observée sur une C18, mais avec une résolution et une sélectivité augmentées. Une rétention inattendue et accrue de composés polaires a été mise en évidence.



ODS, ODS1, ODS2, ODS3, ODS-AM, RP-18, ODB, HDO... sont des greffages octadécylé avec des chimies différentes.

*Le choix du greffage est à définir en fonction du soluté*

Composés à analyser	Greffage proposé
Composés à faible volume hydrocarboné	Phase normale (silice ou diol)
Composés à volume hydrocarboné moyen	Phase inverse (C18, C8, C4...)
Composés à gros volume hydrocarboné	Phase inverse (C4, C8, C18...)
Amines	Silice ultra pure "end-capped" conseillée
Aldéhydes, cétones	Silice non "end-capped" (les silanols résiduels aident à la séparation)
Phosphates	Silice non ultrapure
Composés comprenant un groupement aromatique	Greffage Phenyl
Composés comprenant un groupement carboxylique	Greffage Cyano
Sucres	Greffage NH <sub>2</sub> ou NMe <sub>2</sub>
Si vous souhaitez travailler avec un éluant comportant de l'eau en phase normale	Diol et non silice vierge
Droque dans fluide biologique	"Mixed mode" (RP, SCX, ...)

Les C18 étant les colonnes les plus souvent employées, ce guide leur consacre un chapitre entier.

## 2.3 Limite de pression

Les colonnes HPLC (support silice) sont remplies sous très haute pression (500-800 bars). Néanmoins, il est recommandé de ne pas utiliser les colonnes à une pression continue supérieur de 3500psi (250 bars). Travailler à des pression élevées limite la durée de vie de la colonne et surtout provoque une usure prématurée des joints haute pression de la pompe HPLC.

Valeur type de colonne Uptisphere 250 x 4,6mm ; 5  $\mu$ m :

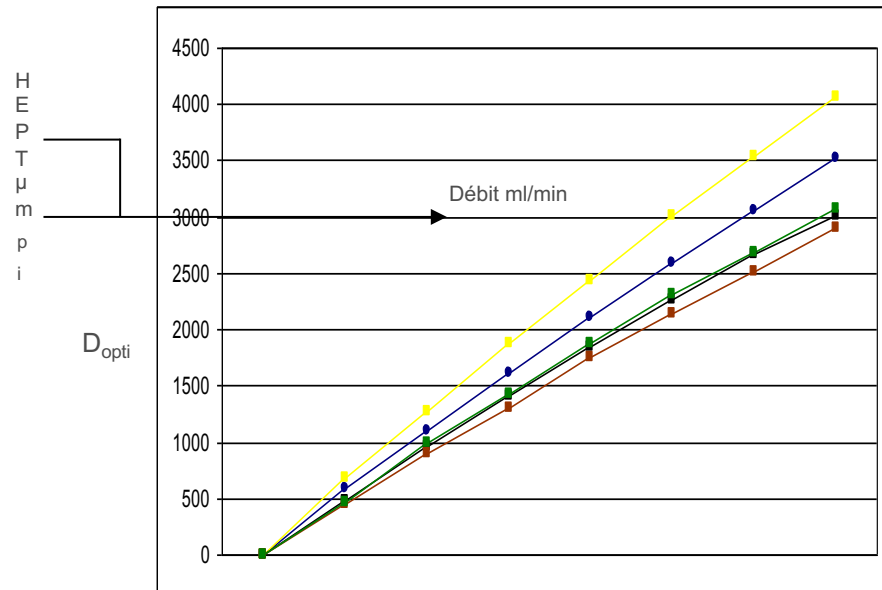
Phase mobile : 1mL/min, 25°

ACN/H<sub>2</sub>O 60/30 100 bars

MeOH/H<sub>2</sub>O 70/20 160 bars

## 2.4 Choix du débit

Les colonnes HPLC à base de silice peuvent théoriquement accepter tout débit à condition de respecter une pression correcte. Relation type de la pression en fonction du débit sur les colonnes Uptisphere C18 :



UP5HDO

UP5ODB

**UP5TF**

ECUP5N

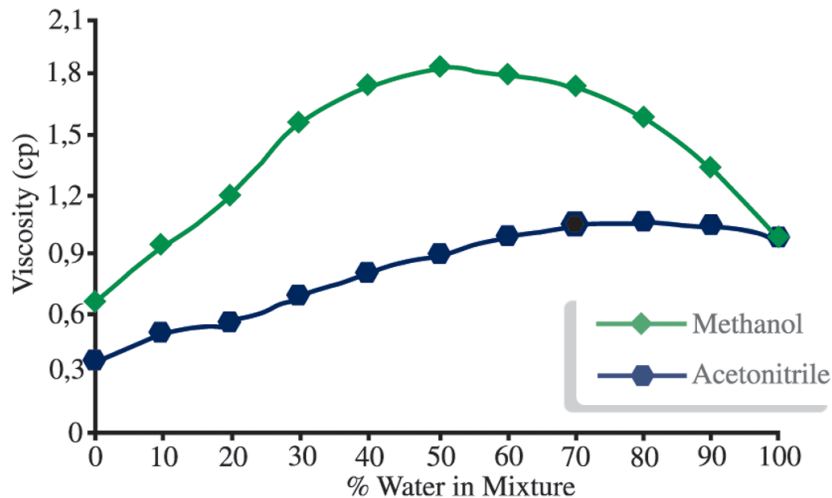
UP5HSC



## 2.5 Choix et optimization de la phase mobile

### *Différence entre méthanol et acétonitrile*

Dans la majorité des cas, le problème se résume à un choix entre méthanol et acétonitrile. L'acétonitrile est moins visqueux, présente une meilleure efficacité et permet de travailler à des débits de phase mobile plus importants.



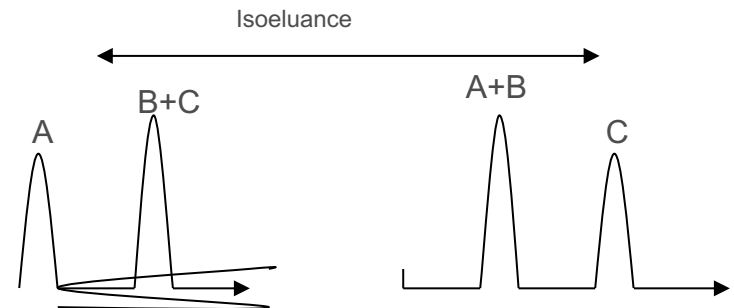
*Variation de la viscosité entre le méthanol et l'acétonitrile*

Règle d'isoélution :  $\phi \text{ AcN} = 0.78\%$   $\phi \text{ MeOH}$   
 $\phi \text{ THF} = 0.62\%$   $\phi \text{ MeOH}$

Par exemple : un mélange 50% MeOH – 50% eau équivaut )  
39% can – 61% eau  
31% THF – 69% eau

Phase mobile 1 =  
20/50 MeOH/H<sub>2</sub>O

Phase mobile 2 =  
39/61 CAN/H<sub>2</sub>O



## 2.6 Choix de la température

Il est important de thermostatier la colonne ET la tubulure (notamment afin d'éviter un gradient de température au sein même de la colonne).

En général, le travail à haute température facilite la séparation, la diffusion des composés dans les deux phases en est favorisée, d'où l'augmentation des vitesses de transfert entre la phase stationnaire et la phase mobile et donc, le nombre d'échanges.

## 2.7 Influence du volume de la boucle d'injection

Colonne Uptisphere ODB 150*4.6mm, 5µm					
Boucle(µl)	10µL	20µL		50µL	
Efficacité(N)	Nref		ΔN%		ΔN%
Toluène	9518	7116	-25%	2603	-72%
Naphtalène	9251	7276	-21%	2613	-71%

Le volume à injecter doit être inférieur à 1/100 du volume mort  $V_0$  de la colonne, sachant que  $V_0 \approx 65\%$  du volume géométrique de la colonne. Pour une bonne reproductibilité, il est conseillé de remplir la boucle d'injection avec un volume cinq fois supérieur à celui de la boucle.

## 2.8 Influence du volume mort crée par la tubulure entre injecteur et colonne

Diamètre interne (mm)	0.25	0.75		0.75	
Longueur(mm)	100	100		200	
Efficacité (N)	Nref		$\Delta N\%$		$\Delta N\%$
Toluène	9518	6819	-28%	4982	-27%
Naphtalène	9251	7030	-24%	5470	-22%

Le tableau montre bien la perte d'efficacité due à une longueur et ou à un diamètre interne du capillaire trop important.

## 2.9 Choix du diamètre du tubulure

Diamètre interne de colonne(mm)	Diamètre interne de tubulure(mm)	Débit (mL/min)
1.0-2.1	0.15	0.05-0.2
2.1-3.0	0.15-0.20	0.20-0.50
3.0-3.9-4.0-4.6	0.20-0.25	0.50-1
4.6-6.0-7.8-9.4-10	0.25	2-10
10-21.2	0.25-0.50	10-25
50	0.5-1	50-100

## Étape 3 : Les détecteurs

### RAPPEL

La hauteur limite de détection d'un composé est équivalente à trois fois la hauteur du bruit de fond.  
La limite de quantification d'un composé est équivalente à dix fois la hauteur du bruit de fond.

### 3.1 Détecteur UV (185-400nm)

Pour des composés à base aromatique

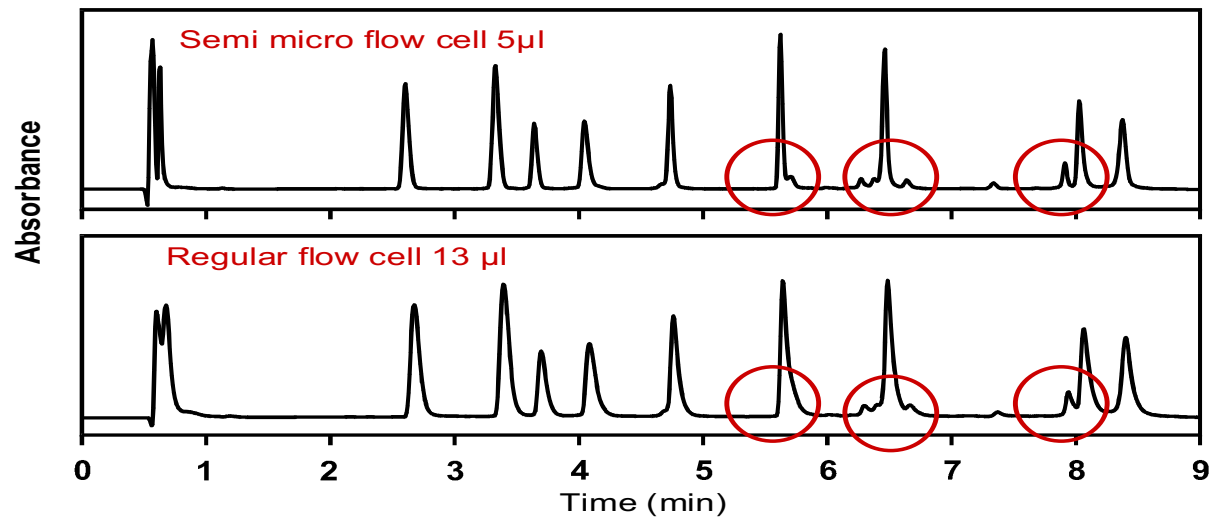
- Spectrophotomètre UV

La détection se fait à une longueur d'onde donnée.

- Barrette de diodes

Permet d'obtenir un chromatogramme pour chaque longueur d'onde choisie

*Influence du volume de la cellule de détection d'un spectrophotomètre UV*



La résolution est augmentée avec une cellule de détection de faible volume mais attention :

- À ne pas injecter une solution trop concentrée (risque de saturation)
- À la suppression si le débit est le même (risque de casser la cellule de détection)

### 3.2 Détecteur de fluorescence

Pour des composés ayant beaucoup d'élections  $\pi$  délocalisés comme les hydrocarbures poly-aromatiques, ou rendus fluorescents par dérivation

→ 1000 fois plus sensible que l'U.V.

→ Analyse de traces

### 3.3 Détecteur à indice de réfraction

Pour des composés qui n'absorbent pas dans l'U.V. visible ou en série avec d'autres détecteurs.

Mesure la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et le composé.

→ Détecteur universel

→ Moins sensible que l'UV

→ Dérive de la ligne de base à la moindre variation de température et de pression

### 3.4 Détecteur à spectrométrie de masse

Pour tous les composés sans limite de concentration et de poids moléculaire.

→ Très bonne sensibilité

→ Renseignements sur la structure du composé

→ Lons différents suivants le solvant de la phase mobile

→ Relativement compliqué à mettre en place

## Étape 4 : Optimisation

La géométrie de colonne, le débit, la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire sont des paramètres qui influent énormément sur la séparation et la résolution en chromatographie.

Leur contrôle nécessite de grandes connaissances et de l'expérience.

Quel est l'objectif majoritaire et prioritaire ?

**Performance** : meilleure séparation du mélange, détection minimal

**Coût** : temps d'analyse, quantité de solvant, durée de vie du matériel

**Moyens permettant d'optimiser la résolution**

Il s'agit de jouer sur ces différents paramètres :

### 1/ Paramètres stationnaires

Chaîne HPLC (injecteur, filtre, précolonne, tubulure, colonne,...)

Détecteurs (cellule de détection, mode de détection,...)

## 2/ Paramètres dynamiques

### Augmenter $k$ , changer :

- La composition de phase mobile
- La surface spécifique du support
- Le taux de greffage

### Augmenter $\alpha$ , changer :

- La nature du solvant organique
- Le pH du tampon

### Augmenter $N$ , changer :

- Le débit de la phase mobile
- La longueur de la colonne
- Le diamètre de particule

Tous ces paramètres ont été traités dans les paragraphes précédents.



## Étape 5 : Memo

Beaucoup de paramètres ont été évoqués lors de ce guide, voici quelques rappels utiles :

- Longueur de la colonne : l'efficacité augmente avec la longueur de la colonne.
- Diamètre de la colonne : le seuil de détection augmente quand le diamètre de colonne diminue.
- Diamètre des particules : l'efficacité augmente quand le diamètre des particules diminue.
- Phase mobile : l'acétonitrile est plus efficace que le méthanol.
- Greffage, silice attention au pH.
- Solution tampon :  $pK_a + 2 < pH < pK_a - 2$
- Si le  $pK_a$  est trop bas ou trop haut penser à utiliser un contre-ion.
- Pour des analyses répétables il faut stabiliser la colonne en la rinçant avec la phase mobile.
- Le volume doit être au moins égal à l'équivalent de :
  - 10 ou 20 x  $V_0$  en mode inversé de phase
  - 50 x  $V_0$  en mode normal de phase